

Aus dem II. Anatomischen Institut der  
Freien Universität Berlin  
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

**Untersuchungen über den Gaumenschluß bei  
normalen und 6-Aminonikotinamid  
behandelten Rattenembryonen in vitro**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
zahnmedizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Rainer Brechler**  
Schönlanke

**1972**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem II. Anatomischen Institut der

Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

**Untersuchungen über den Gaumenschluß bei  
normalen und 6-Aminonikotinamid  
behandelten Rattenembryonen in vitro**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
zahnmedizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Rainer Brechler**  
Schönlanke

Referent: Prof. Dr. med. Hans-Joachim M e r k e r

Korreferent: Prof. Dr. med. Elisabeth K ö h l e r



Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen  
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 29. März 1972

## INHALTSVERZEICHNIS

Seite

|      |                       |    |
|------|-----------------------|----|
| I.   | Einleitung            | 1  |
| II.  | Material und Methoden | 7  |
| III. | Befunde               | 13 |
| IV.  | Diskussion            | 19 |
| V.   | Zusammenfassung       | 25 |
| VI.  | Literaturverzeichnis  |    |
| VII. | Bildmaterial          |    |



## EINLEITUNG

Die klassischen Beschreibungen der Morphologie des Gaumenschlusses haben in jahrzehntelanger intensiver Forschung einen einheitlichen Mechanismus erkennen lassen, der sich bei Ratte und Mensch in vielen Einzelheiten und größeren Abschnitten ähnelt. Das Prinzip dabei ist, durch eine horizontale Trennung die primäre Mundhöhle in die definitive Mund- und Nasenhöhle zu unterteilen. (BURDI and FAIST, 1967; COLEMAN, 1965; FAIST and BURDI, 1967; FULTON, 1957; HUGHES et al., 1967; JACOBS, 1964; PETER, 1913; ROSS and WALKER, 1967; STEFFEK, 1968; SWENEY and SHAPIRO, 1970; TÖNDURY, 1961; VERRUSIO, 1970; WALKER, 1961; 1968; 1971 a + b; WALKER and FRASER, 1956; ZEILER et al., 1964)

Natürlich bestehen in Abhängigkeit von der sehr unterschiedlichen Tragdauer bei den einzelnen Species große zeitliche Differenzen. Bei der Ratte bilden sich ab Tag 12 am seitlichen Dach der primären Mundhöhle die Gaumenfortsätze aus. Diese beiden Gaumenfalten bestehen aus proliferierten Mesenchymzellen und Interzellulärsubstanz und sind von einem doppelschichtigen Epithel überzogen, das sonst auch in der restlichen Mundhöhle vorzufinden ist. Die Falten wachsen zwischen der lateralen Zungenbegrenzung und der Innenwand der primären Mundhöhle nach vertikal. Zu diesem Zeitpunkt ist die primäre Mundhöhle nahezu vollständig von der sich entwickelnden Zunge ausgefüllt. Während der normalen Entwicklung richten sich diese beiden

Gaumenfalten am späten Tag 15 oder am frühen Tag 16 auf, gelangen in eine horizontale Position oberhalb des Zungenrückens, verschmelzen dann schließlich miteinander und mit dem nach caudal vorgewachsenen Unterrand des Nasenseptums in der Medianebene und bilden so die definitive Mundhöhle und die bleibenden Nasenhöhlen. Bei der eigentlichen Verschmelzung lagern sich die beiden medialen Flächen der Gaumenfalten aneinander, verkleben und werden dann vermutlich mit Hilfe eines lysosomalen Systems aufgelöst, so daß sie von Mesenchym durchdrungen und ersetzt werden können. Nähere Angaben über den von uns benutzten Rattenstamm siehe BLUNK (1970), LEIMEISTER (1970) und NEUNER (1970).

Die histologischen Vorgänge während der Bildung dieses Sekundären Gaumens sind hier bereits ausführlich beschreiben worden.

Welche Rollen bei diesem komplizierten Vorgang nun dem Epithel und welche im einzelnen den mesenchymalen Bestandteilen der Gaumenfalten zuzuschreiben sind, konnte bisher nicht restlos geklärt werden. Viele Autoren sind der Auffassung, daß anfangs während der Wachstums- und der folgenden Umlagerungsphase die größere Aktivität im Mesenchym vorzufinden ist, während beim eigentlichen Verschmelzungsvorgang dem Epithel die wichtigere Bedeutung beizumessen sei. Das bezieht sich vor allem auf den äußerst medialen Anteil des Epithels der Gaumenfalte, denn nur dieser ist in der Lage mit dem entsprechenden Bezirk der anderen Seite zu verkleben

und zu verschmelzen (GOSS et al., 1970; MYERS et al., 1968; POURTOIS, 1966). Die Funktionen, die den mesenchymalen Bestandteilen der Gaumenfalten während der eigentlichen Umlagerungs- und Aufrichtungsperiode zuzuschreiben sind, lassen sich in ihrer Mechanik zwar beschreiben, ihre ursächlichen und auslösenden Faktoren können aber nicht exakt bestimmt werden, da sehr zahlreiche endogene sowie exogene Momente dieses komplizierte Wirkungsgefüge beeinflussen. Zusammenfassend kann man heute die folgenden Theorien anführen, die ursächlich oder unterstützend für eine Umlagerung der Gaumenfalten diskutiert werden:

A. Endogene, d.h. in den Falten selbst lokalisierte Faktoren:

1. Ein seitenungleicher Proliferationsdruck
  - (a) des Epithels
  - (b) des Mesenchyms
2. Ein Wechsel des Turgors, hervorgerufen durch Zustandsänderungen der Interzellulärsubstanz, speziell der Glykosaminoglycane (GAG).
3. Unterschiedliche Blutfüllungen der weiten sinusartigen Blutgefäße in der Faltenbasis.
4. Muskuläre Aktivität.

B. Exogene, d.h. außerhalb der Falten lokalisierte Faktoren:

1. Deszendens der Zunge, verursacht durch
  - (a) beschleunigtes Längenwachstum des aufsteigenden Astes des Unterkiefers,
  - (b) Streckung der Wirbelsäule infolge motorischer Aktivität.

## 2. Streckung der Schädelbasis

## 3. Aktive Zungenbewegung

## 4. Einstrom von Fruchtwasser.

Zusammenfassende Literatur über diese Probleme siehe: ANDREW and ZIMMERMAN, 1971; BRADFORD, 1968; CALLAS and WALKER, 1963; DRILLIEN et al., 1966; LYNCH et al., 1966; HUMPHRY, 1968; ROSS, 1960; ROSS and LINDSAY, 1965; ROSS and WALKER, 1967; SHAPIRA, 1969; TRASLER and FRASER, 1963; VERRUSIO, 1969; WALKER, 1957, 1959, 1961, 1968, 1969; WALKER and CRAIN, 1960.

Die Wichtigkeit und funktionelle Bedeutung der endogenen und exogenen Faktoren, die Notwendigkeit ihres gemeinsamen Zusammenwirkens und die Möglichkeit der Hemmung einzelner Faktoren mit unverändertem, normalem oder abweichendem, pathologischem Resultat kann in vivo häufig nur schlecht beurteilt werden. Zwar geben Untersuchungen der experimentellen Teratologie einige Hinweise, jedoch muß dabei das Problem der Austauschbarkeit von Faktoren und der Kompensation unter in vivo-Bedingungen unberücksichtigt bleiben. Häufig greifen auch teratogene Substanzen an mehreren Stellen während des Gaumenschlusses an, so daß die Interpretation von Ergebnissen trotz eines bekannten Wirkungsmechanismus nicht sicher gelingt. An dieser Stelle soll zum Beispiel das Cortison erwähnt werden: es greift wahrscheinlich am Synthesevorgang bei der Bildung der Interzellulärsubstanz an. Dieser Angriffspunkt betrifft aber sowohl das Mesenchym der Gaumenfalten selbst als auch das Stützgewebe im Bereich der Schädelbasis und der Kiefer.

Darüberhinaus hemmt Cortison auch die Proliferation der Zellen in allen beteiligten mesenchymalen Geweben (ANDREW and ZIMMERMAN, 1971; DOSTAL, 1971; JACOBS, 1964, 1966; LARSSON, 1960; WALKER, 1957). Ähnliches gilt auch für das teratogen sehr wirksame Mittel 6-Aminonikotinamid (6-AN), mit dem nach einmaliger Gabe zwischen Tag 12 und Tag 16 bei Rattenembryonen in fast 100% Gaumenspalten erzeugt werden können. Diese Substanz scheint durch Hemmung der 6-Phosphogluconatdehydrogenase vorwiegend an den Abkömmlingen des Ektoderms anzugreifen. Damit würde aber ebenfalls ein Angriffspunkt sowohl an endogenen als auch an den exogenen Faktoren möglich sein. Die Hemmung der Nervenreifung würde die Motorik des Embryos und somit im Endeffekt die Störung der Zungenbewegung nach sich ziehen; die direkte Einwirkung auf das Epithel der Gaumenfalten dagegen würde ihr Wachstum und möglicherweise auch ihre Aufrichtung beeinflussen. Die Erzeugung von Gaumenspalten durch Muskelrelaxantien zum Beispiel würde zwar einen Angriffspunkt allein an einem Teil der exogenen Faktoren bedeuten - am motorischen System -, jedoch sind diese Ergebnisse noch umstritten und der genaue Angriffspunkt ist längst nicht sicher bekannt (WALKER, 1968 a und b, 1969). Die genauere Bedeutung der einzelnen Faktoren, die bei der Hebung der Falten und damit beim Gaumenschluß eine wichtige Rolle spielen, scheint also allein durch in vivo-Versuche nicht sicher erfaßbar zu sein. Hier könnten in vitro-Versuche weiterführen. Die Möglichkeit einer Züchtung von Kopfteilen mit den Gaumenfalten ist schon durch Untersuchungen von

VARGA (1967), REEVE et al. (1966), CHAUDRY (1967), TURBOW, CHAMBERLAIN (1968), MORIARTY et al. (1963), MYERS et al. (1968), MYERS (1971), POURTOIS (1966, 1970, 1971), GOSS et al. (1970) nachgewiesen worden. Diese Autoren konnten die Möglichkeit eines Gaumenschlusses unter Kulturbedingungen histologisch beweisen. Dieses Modell konnte es also ermöglichen, die endogenen Faktoren gesondert genauer zu studieren und den Angriffspunkt teratogener Substanzen zu erfassen. Solche teratogenen Substanzen, die die Verschmelzung der Gaumenfalten *in vitro* hemmen, müßten mit großer Wahrscheinlichkeit einen der endogenen Faktoren stören. Das wäre gerade für die Beurteilung und Aufklärung der Wirkungsweise des 6-AN sehr verdienstvoll. Da wir mit einer von TROWELL (1959) angegebenen Kultivationsmethode für grössere Gewebestücke gute Erfahrungen gemacht haben, züchteten wir auch auf diese Weise die Oberkieferpräparate. Dabei kam es uns auf die Erfassung der morphologischen Vorgänge während des Gaumenschlusses *in vitro* an, auf ihren Vergleich mit den normalen *in vivo*-Verhältnissen und auf die Darstellung eines Effektes von 6-AN *in vitro*.

## MATERIAL UND METHODEN

Das Gewebematerial für diese Untersuchungen stammt aus Rattenembryonen vom Tag 15 + 5-7.

Die Ratten erhielten wir aus einem eigenen Inzuchtstamm, der aus einem Wistarstamm herausgezüchtet wurde. Alle Tiere wurden durch künstliche Beleuchtung in einem umgekehrten Tag-Nacht-Rhythmus in temperatur- und feuchtigkeitsgeregelten Ställen bei gleicher Nahrungszusammensetzung gehalten. Folgendes Vorgehen wurde angewandt, um die Trächtigkeitsdauer exakt festlegen zu können: Durch den umgekehrten Tag-Nacht-Rhythmus wird eine Verschiebung der Begattungszeit, die normalerweise zwischen 0.00 und 2.00 Uhr stattfindet, auf 7.30 bis 10.00 Uhr erreicht. Um die Embryonenausbeute noch erhöhen zu können, wurden nur Tiere im Pro-östrus, der durch Abstrichsuntersuchungen ermittelt wurde, den Böcken zugesetzt. Anschließend mußte durch weitere Ausstrichsuntersuchungen ein positiver Spermienbefund festgestellt werden. Bei diesem Zuchtverfahren sind gegen 8.00 Uhr bereits 80% der Tiere besprungen. Die ersten 24 Stunden bis zum nächsten Tag 8.00 Uhr werden als Tag 0, die nächsten als Tag 1, usw. bezeichnet. Eine weitere Unterteilung ist möglich, indem man die entsprechenden Stunden dem jeweiligen Tag ab 8.00 Uhr hinzurechnet: z.B. 15.00 Uhr des Tag 2 entspricht Tag 2 + 7 (Stunden).

Am Tag 14 + 8-9 wurde den Muttertieren eine einmalige Dosis von 8 mg/kg Körpergewicht 6-AN

intra peritoneal injiziert.

#### Präpariertechnik:

Am Tag 15 + 5-7 wurden die Ratten mit Äther leicht anästhesiert und durch Genickschlag getötet. Das Abdomen wurde mit Alkohol abgespritzt nachdem der Bauchraum mit sterilen Instrumenten eröffnet war. Der Uterus wurde herauspräpariert und in steriler Hanks' Lösung gespült, anschließend wurden die Embryonen einzeln dem Uterus und den embryonalen Häuten entnommen und auch in Hanks' Lösung gespült. Während dieser und allen weiteren Vorgängen wurde strikte Sterilität eingehalten.

Die Gewinnung der Kieferpräparate geschah folgendermaßen: Auf die Arbeitsplatte des Seziermikroskops wurde eine Petrischale, die mit einem Filterpapier ausgelegt und mit Hanks' Lösung getränkt war, gestellt. Der Embryo wurde seitlich auf dieses Filterpapier gelegt und am Hinterkopf mit einer Pinzette fixiert. Ein erster Schnitt erfolgte mit einem Starmesser von der Maulspitze durch die Augen zum Hinterkopf und trennte die Hirnbläschen ab. Ein weiterer Schnitt wurde folgendermaßen gelegt: Durch geringen Druck auf die seitlichen Mundwinkel senkte sich der Unterkiefer mit der Zunge, so daß beide mit dem restlichen Körper abgetrennt und verworfen wurden und das Gewebestück gleichzeitig mit der oralen Oberfläche und den unbeschädigten Gaumenfalten nach oben zu liegen kam. Von dieser Gewebescheibe wurde weiterhin der Teil hinter der dorsalen Pharynxwand abgetrennt bis man einen Gaumenschnitt von ca. 1 mm Dicke, 5 mm Länge und 4 mm Breite erhielt. Dieser

Gaumenschnitt bestand aus Maxillargewebe mit den Gaumenfalten und Oberlippen, Teilen des Nasenseptums und der Kapsel. Zu diesem Zeitpunkt waren beide Gaumenfalten noch getrennt, sowohl bei den Versuchs- als auch bei den Kontrolltieren. Anschließend wurden die Gaumenschnitte bis zur Kultivation wieder in Petrischalen in Hanks' Lösung gelegt und zwar immer mit der oralen Fläche nach oben.

#### In vitro Kultur:

Die Gaumenschnitte züchteten wir nach einem modifizierten, von TROWELL(1959) angegebenen Kultivierungsverfahren. In Kunststoffpetrischalen (Hersteller: Falcon, Durchmesser 6 cm) wurden ca. 4 cm lange Brücken aus V2A Stahldrahtgaze gelegt und mit Membranfilterstreifen (Hersteller: Sartorius, Porendurchmesser 1,2  $\mu$ ) bedeckt. Die Drahtbrücken waren ca. 2 mm hoch, so daß 5 ml des Nährmediums gerade bis an den Unterrand des Membranfilterstreifens reichten. Wir verwendeten modifiziertes Yelp-Medium zur Kultivation.

#### Zusammensetzung - Yelp-Medium:

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| Yeast-Extrakt                         | 0,5 g    |
| Eagle-Aminosäure-Stammlsg. (100-fach) | 5,0 ml   |
| Eagle-Vitamin-Stammlsg. (100-fach)    | 2,0 ml   |
| Lactalbuminhydrolysat                 | 2,5 g    |
| Bacto-Pepton                          | 5,0 g    |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 1,4 g    |
| Hanks' BSS (10-fach)                  | 100 ml   |
| Aqua dest.                            | 900 ml   |
| Glutamin                              | 0,29 g/l |

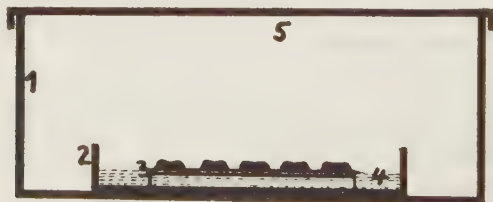
# Zusammensetzung - Hanks' Lösung (HBSS):

|                                                      |             |
|------------------------------------------------------|-------------|
| NaCl                                                 | 8000,0 mg/l |
| KCl                                                  | 400,0 mg/l  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O | 60,0 mg/l   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 60,0 mg/l   |
| MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O                | 200,0 mg/l  |
| CaCl <sub>2</sub> wasserfrei                         | 140,0 mg/l  |
| Glucose                                              | 1000,0 mg/l |
| Phenolrot                                            | 10,0 mg/l   |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 350,0 mg/l  |

Das Medium wurde steril filtriert und mit 100 IE/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin angereichert.

Die gewonnenen Gaumenschnitte wurden vorsichtig den Petrischalen entnommen, auf die vorbereiteten Membranfilterstreifen gelegt und mit einem Tropfen Kulturmedium zusätzlich befeuchtet. Die Kultivation erfolgte für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Sättigung.

## Zeichnung 1:



1. Inkubationsbehälter
2. Petrischale
3. V2A-Stahldrahtgazebrücke, Membranfilter, Gaumenschnitte
4. YELP-Kulturmedium (5 ml modifiziert)
5. Luft mit 5% CO<sub>2</sub> Zusatz

Fixierung und weitere Bearbeitung:

Die kultivierten Gaumenschnitte wurden für die lichtmikroskopische Untersuchung in Bouin'sche Lösung für 24 Stunden gelegt. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet, Serienschnitten hergestellt und mit Azan gefärbt.

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Gaumenschnitte mit den Membranfiltern nach 24-stündiger Fixation in Karnowski's Lösung (3% Glutaraldehyd, 3% Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer, pH 7,2) ausgewaschen. Dann folgte eine Nachfixation mit 1%-iger  $\text{OsO}_4$ -Lösung (Phosphatpuffer 7,2). An eine weitere Waschung in Cacodylatpuffer schloß sich eine Entwässerung in der aufsteigenden Acetonreihe an, wobei sich hier die Membranfilter in den höheren Konzentrationen vollständig auflösten. Anschließend wurden die Gaumenschnitte in flachen Petrischalen in Mikropal eingebettet und bei 60°C polymerisiert.

Nach dem Aussägen und Zuspitzen der Präparate erfolgt die Herstellung der Schnitte mit LKB-Ultratomen und Reichert-Mikrotomen. Dann schloß sich eine Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat an. Die Aufnahmen wurden in Siemens Elmiskopen 1 und 1 a mit einer Strahlenspannung von 80 kV im Vergrößerungsbereich 2000-40000 bei einer Blende von 50/200  $\mu$  hergestellt. Die weitere Beurteilung und Auswertung erfolgte an 3,5-fachen positiven Papiervergrößerungen.

Um sich im Block orientieren zu können, ist die lichtmikroskopische Betrachtung erforderlich. Dazu stellen wir sog. Semidickschnitte von 1  $\mu$

Dicke her, die mit 50%-iger wässriger Giemsalösung mit Boraxzusatz in Wärme angefärbt wurden.

## BEFUNDE

### 1. Lupenbefunde:

Unmittelbar nach Ende der Kultivation wurden die Gaumenschnitte auf eine Zusammenlagerung hin untersucht und nach dem Grad der Zusammenlagerung in drei Gruppen unterteilt. In der Gruppe 1 bei den Kontrollen erfaßten wir alle die Gaumenschnitte, die vollständig geschlossen aussahen, jedoch eventuell eine noch sehr geringe Kerbe der Uvula zeigten. Gruppe 3 enthielt alle Präparate, die keinen Schluß zeigten und alle anderen Zwischenformen zählten wir der Gruppe 2 zu. Bei den Tieren, die nicht 8 mg/kg 6-AN behandelt waren, wurde die gleiche Einteilung beibehalten. Die in zwei Versuchen ermittelten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefaßt:

Tabelle 1:

|             | Gruppe 1 |    | Gruppe 2 |    | Gruppe 3 |    | Total |     |
|-------------|----------|----|----------|----|----------|----|-------|-----|
|             | Anz.     | %  | Anz.     | %  | Anz.     | %  | Anz.  | %   |
| Versuch 1   | 13       | 77 | 1        | 5  | 3        | 18 | 17    | 100 |
| Kontrollen  |          |    |          |    |          |    |       |     |
| Versuch 2   | 26       | 79 | 5        | 15 | 2        | 6  | 33    | 100 |
| Versuch 1   | 2        | 11 | 4        | 24 | 11       | 65 | 17    | 100 |
| 8mg/kg 6-AN |          |    |          |    |          |    |       |     |
| Versuch 2   | 2        | 7  | 2        | 7  | 24       | 86 | 28    | 100 |

Nach der Fixierung erfolgte zur Kontrolle noch eine weitere Untersuchung, die dabei mit der gleichen Systematik gewonnenen Ergebnisse sind in Ta-

belle 2 zusammengefaßt:

Tabelle 2:

|              | Gruppe 1 |    | Gruppe 2 |    | Gruppe 3 |    | Total |     |
|--------------|----------|----|----------|----|----------|----|-------|-----|
|              | Anz.     | %  | Anz.     | %  | Anz.     | %  | Anz.  | %   |
| Versuch 1    | 14       | 82 | 2        | 12 | 1        | 6  | 17    | 100 |
| Kontrollen   |          |    |          |    |          |    |       |     |
| Versuch 2    | 19       | 58 | 4        | 12 | 10       | 30 | 33    | 100 |
| Versuch 1    | 2        | 12 | 2        | 12 | 13       | 76 | 17    | 100 |
| 8 mg/kg 6-AN |          |    |          |    |          |    |       |     |
| Versuch 2    | 1        | 4  | 2        | 7  | 25       | 89 | 28    | 100 |

Ein unter den gleichen Kulturbedingungen durchgeführter Versuch, der als Kulturmedium das bereits beschriebene Medium YELP und Rattenserum vergleichen sollte, zeigte nachstehendes Ergebnis in Tabelle 3: Hierbei wurden die unbehandelten Tiere in zwei Gruppen unterteilt - in Gruppe 1 wurden wieder alle Tiere zusammengefaßt, die bis auf geringe Uvulakerben eine vollständige Zusammenlagerung zeigten, Gruppe 2 dagegen enthielt alle anderen Gaumenschnitte (d.h. hier, sowohl die unvollständig geschlossenen als auch die offenen).

Tabelle 3:

|             | Gruppe 1 |    | Gruppe 2 |    | Total |     |
|-------------|----------|----|----------|----|-------|-----|
|             | Anz.     | %  | Anz.     | %  | Anz.  | %   |
| Medium YELP | 7        | 64 | 4        | 36 | 11    | 100 |
| Rattenserum | 6        | 55 | 5        | 45 | 11    | 100 |

## 2. Lichtmikroskopische Befunde:

Um die bisher zur Beurteilung der in vitro-Präparate herangezogenen Kriterien genauer zu erfassen und zu kontrollieren, sind natürlich histologische Untersuchungen notwendig. Nur dann gelingt die Entscheidung, ob die Gaumenfalten wirklich zusammengewachsen sind und damit als verschmolzen bezeichnet werden können. Um diese Aussage sicher zu machen muß gefordert werden, daß das Epithel an der Verschmelzungsstelle zu einem großen Teil verschwunden ist und das Mesenchym beider Faltenseiten sich ohne erkennbare Grenze vereinigt hat. In den von uns untersuchten und als geschlossen bezeichneten Präparaten konnten diese morphologischen Kriterien tatsächlich dargestellt werden. Zur Luftphase hin kommt es zu einem dichten etwa 300  $\mu$  breiten Saum, der bei kleiner und mittlerer Vergrößerung keine weiteren Einzelheiten zeigt. Im Elektronenmikroskop lassen sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem übrigen Gewebe darstellen, so daß die Dichte wesentlich durch den abweichenden Wassergehalt erklärt werden kann.

Nach Applikation von 6-AN ließen sich in den nicht geschlossenen Falten keine histologisch faßbaren Veränderungen nachweisen, die mit Sicherheit auf eine Wirkung der Substanz zurückgeführt werden könnten. Bei den Präparaten, die trotz Behandlung als geschlossen bezeichnet wurden, konnten ebenfalls keine Abweichungen von der Norm beobachtet werden. Der eigentliche Wirkungsmechanismus oder etwa der Angriffspunkt von 6-AN

kann also mit der angewandten lichtmikroskopischen Methodik nicht genauer definiert werden.

### 3. Elektronenmikroskopische Befunde:

Das normale Bild der Gaumenfalten vor und während des Zusammenwachsens und Verschmelzens in vivo ist in den Doktorarbeiten von BLUNK (1970), LEI-MEISTER (1970) und NEUNER (1970) in allen Einzelheiten beschrieben worden, aufgeschlüsselt nach den dabei beteiligten Bestandteilen: Epithel, Mesenchym, Blutgefäße und Nerven. Die Beschreibung der in vivo Verhältnisse soll deshalb hier nicht wiederholt werden.

Unter in vitro Bedingungen ist das histiotypische Verhalten der Gaumenfalten noch unverändert. Abgesehen von den Schnittflächen zum cranialen, d.h. Gehirnteil hin, sind Mund- und Nasenhöhenschleimhaut sowie Außenhaut noch kontinuierlich erhalten und die verschiedenen mesenchymalen und epithelialen Verbände im Inneren der Präparate noch auseinander zu halten und zu definieren.

Im Bereich der Gaumenfalten selbst findet sich bei genauerer Inspektion ein lockeres Mesenchym, dessen Zellen weite Interzellularräume zwischen sich fassen und mit unterschiedlich langen und breiten Fortsätzen punktförmigen Kontakt untereinander haben. Die Zellen selbst enthalten die auch für in vivo Verhältnisse typischen freien Ribosomen, einige Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums, einen kleinen vesikulären Golgiapparat und einige kleine cristae- und matrixarme

Mitochondrien. Ein Strukturelement tritt jedoch auf, das nur in der Kultur in dieser Ausprägung zu finden ist: Cytolysosomen (autophagic vacuoles). Diese Einschlüsse entstehen durch das Einschmelzen von Zellbestandteilen und sind charakterisiert durch eine Membranbegrenzung, einen sehr wechselnden Inhalt und Größe. Der Inhalt besteht aus Zytoplasmabestandteilen und ihren Abbauprodukten bis hin zu einem nicht mehr identifizierbaren granulären oder myelinartigen Material. Die Kieferpräparate von 6-AN-behandelten Tieren zeigen keine Abweichungen von diesem Bild.

Das Epithel dagegen weist deutliche Veränderungen unter dem Einfluß von 6-AN auf. Ohne Behandlung besteht es aus einem kontinuierlichen Epithelverband, dessen Dicke in Abhängigkeit von der Lokalisation wechselt. Wir finden manchmal an der Faltenbasis sogar noch einschichtig kubisches Epithel. An den übrigen Stellen herrscht ein zweischichtiges Epithel vor, bei dem noch die typische Anordnung - basal kubisches, apikal flaches Epithel - erhalten geblieben ist. An einzelnen Stellen entwickelt sich unter den Bedingungen unserer Kultur eine Mehrschichtigkeit des Epithels. Die Kontaktverhältnisse entsprechen weitgehend den in vivo Verhältnissen, jedoch nimmt die Menge und Weite der Interzellularräume ab. Nach Applikation von 6-AN und folgender Kultivierung finden wir in vielen Epithelzellen eine charakteristische Veränderung: - die perinucleäre Zysterne erweitert sich und ist teilweise so extrem gebläht, daß das Cytoplasma nur noch als schmaler Saum in der Peripherie der

Zelle vorhanden ist. Der Kern selbst und die übrigen Zellorganellen sind jedoch weitgehend intakt. Höchstens die Zahl der Organellen hat etwas abgenommen. Beim Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen fällt darüberhinaus auf, daß die Stellen mit mehrschichtigem Epithel fehlen. Weiterhin sind die veränderten Zellen mit Aufblähung der perinucleären Zysternen überwiegend in der basalen Zellschicht lokalisiert.

## DISKUSSION

Die mit unserer Technik - d.h. mit der Trowell-Organkultur und den beschriebenen Oberkieferpräparaten - erhobenen Befunde weisen eindeutig darauf hin, daß es auch in vitro möglich ist, die Gaumenfalten zur Annäherung und zur Verschmelzung zu bringen. Zweifellos müssen bei der Beurteilung der Befunde bestimmte Kriterien berücksichtigt werden. Es wäre möglich, daß ein Aneinanderlegen der Falten durch Verschieben während der Präparation, Quellungszustände und andere Faktoren unter in vitro Bedingungen den Gaumenschluß vortäuschen kann (BRECHLER und MERKER, 1970). Da aber histologisch eine Vereinigung des Mesenchyms beider Falten und das Verschwinden des Epithels nachgewiesen werden konnte, glauben wir uns berechtigt, unsere Befunde als Gaumenschlußäquivalent deuten zu können. Dieses Ergebnis zeigt aber, daß die Mechanismen, die den wichtigsten Teil bei der Bildung des definitiven Gaumens möglich machen, die Hebung, Umlagerung und Verschmelzung der Gaumenfalten durch die in der Einleitung beschriebenen endogenen Faktoren gesteuert werden. Hier kommt neben dem Proliferationsdruck besonders der durch die Wasserbindung an die GAG der mesenchymalen Grundsubstanz hervorgerufene Turgor in Frage. Nachdem die praktische Anwendbarkeit dieses in vitro Modelles sicher nachgewiesen ist, besteht die Möglichkeit, durch eingehendere Untersuchungen, vor allen Dingen auch mit Hilfe biochemischer Methoden (siehe auch PIELSTICKER, 1972) die dabei ablaufenden Vorgänge genauer zu erfassen.

Die Möglichkeit eines Gaumenschlusses in vitro beweist aber noch nicht, daß unter in vivo Bedingungen die sog. exogenen Faktoren keine Rolle spielen. Bei der Betrachtung eines Querschnittes durch den Kopf eines Rattenembryos zum Zeitpunkt der Entnahme des Oberkieferpräparates fällt deutlich die Notwendigkeit der Beteiligung der exogenen Faktoren auf. Zwischen den bereits voll ausgebildeten aber noch nicht elevierten Falten ist fast fugenlos die Zunge eingepaßt. Jede Faltenhebung setzt eine vorhergehende Lösung und Senkung der Zunge voraus. Das gelingt aber nur, wenn verschiedene Wachstumsvorgänge und motorische Aktivitäten außerhalb des eigentlichen Faltenbereichs eintreten, z.B. die Dorsalflexion des Embryos, die motorische Bewegung des Unterkiefers und das rostrale Wachstum des Unterkieferknochens. Dieser Hinweis auf die Bedeutung der exogenen Faktoren für die morphogenetischen Prozesse in vivo soll darauf hinweisen, daß die Ergebnisse einer Kultivation der Gaumenfalten für die Bearbeitung und Beurteilung einzelner Probleme außerordentlich wertvoll sind, für die Interpretation des hochkomplizierten und aus vielen Einzelschritten zusammengesetzten in vivo Vorganges aber nur mit Vorsicht herangezogen werden können (MERKER, 1972).

Die Funktion der kultivierten Zellen im Gewebeverband scheint wenig gestört zu sein. So sind die Zellorganellen, deren morphologisches Verhalten normalerweise ein feines Indiz für den Grad der Gewebeschädigung und den Funktionszustand darstellt, nicht deutlich verändert. Auch das histiotypische Verhalten von Epithel und Mesenchym und die Abgrenzung dieser beiden Gewebear-

ten entspricht völlig den in vivo Verhältnissen. Als deutlicher Unterschied ist nur das gehäufte Auftreten membranbegrenzter polymorpher Einschlüsse zu erwähnen. Da Zelltrümmer fehlen und aufgrund anderer Versuchsserien mit der gleichen Methodik Verlaufskontrollen angestellt wurden, kann mit Sicherheit gesagt werden, daß es sich hierbei um sog. Zytolysosomen (autophagic vacuoles) handelt. Hier werden in membranbegrenzten Räumen zelleigene Bestandteile mit Hilfe lysosomaler Enzyme eingeschmolzen. Das Vorkommen solcher Lysosomen ist zweifellos als Anpassungsvorgang an die veränderten und sicher nicht mehr optimalen Kulturbedingungen zu verstehen. Das Verhalten dieser Zellen kann am ehesten noch verglichen werden mit hormonabhängigen Zellen, z.B. dem Epithel der Prostata und der Bläschendrüse nach Wegfall der Hormonstimulation. Auch hier reagieren die Zellen mit Einschmelzung derjenigen Strukturen, die sie nicht mehr benötigen (DeDUVE, 1964; NOVIKOFF et al., 1964; MERKER, 1964). So kann aus dem Auftreten der Zytolysosomen zwar auf der einen Seite geschlossen werden, daß die in vitro Bedingungen nicht optimal sind - was nicht zu erwarten war. Auf der anderen Seite ist es aber ein Beweis für die Fähigkeit der Zellen und ihre Vitalität sich veränderten Bedingungen noch anpassen zu können.

Für die Möglichkeit einer Verbesserung der Methode sprechen auch die differierenden Ergebnisse der Kultivation der Oberkieferpräparate in unterschiedlichen Medien. Verschiedene orientierende Versuche, von denen hier in der Arbeit der Vergleich zwischen dem Medium YELP und

Rattenserum beschrieben ist, zeigen, daß die Häufigkeit des Gaumenschlusses auch durch Veränderung der Kultivationsbedingungen beeinflußt werden kann. Dieses Verhalten weist darauf hin, daß eine nicht optimale Versorgung der Gewebe vermutet werden muß, dadurch wird weiterhin das Auftreten von Lysosomen (siehe oben) und das Ausbleiben des Gaumenschlusses zu einem kleinen Prozentsatz auch bei den Kontrollen erklärt. Diese Variationen der Ergebnisse in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen erlauben aber auch eine Stellungnahme zu den Problemen der Ursachen des Gaumenschlusses *in vitro*. Würden die besonderen Bedingungen und Einflüsse, die bei der Kultivation außerhalb des Organismus herrschen, die Veränderung der Faltenstellung und die Verschmelzung fördern und bewirken, wären Unterschiede bei den verschiedenen Inkubationsmedien und auch nach Zusatz teratogener Substanzen nicht zu erwarten.

Aus diesen Gründen kann auch davon ausgegangen werden, daß die Unterschiede zwischen Kontrollen und 6-AN behandelten Kulturen tatsächlich auf einer Wirkung der applizierten Substanz beruhen. Diese Vorstellung eines Angriffspunktes des 6-AN am kultivierten Gewebe liegt nahe, da auch *in vivo* ähnliche Wirkungen zu beobachten sind. Es ist jedoch bisher noch umstritten, wo der Angriffspunkt oder sogar die Angriffspunkte dieser Substanz zu lokalisieren sind (COPER et al., 1971; KOLBE et al., 1971; NEUBERT et al., 1970). Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen kann eine Wirkung an den ektodermalen Abkömmlingen vermutet werden (NEUBERT et al., 1970; MERKER et

al., 1970). Ähnlich wie im kultivierten Gewebe, findet man auch in vivo die eigentümlichen Auftreibungen der perinucleären Zysterne. Die Bedeutung dieser Veränderung ist noch unklar. Da 6-AN zum Teil über eine Hemmung der 6-Phosphogluconatdehydrogenase wirkt, könnte das aufgestaute Gluconat diese Auftreibungen bewirken. Es liegen hier aber zum Teil aus methodischen Gründen keine Beweise für die Richtigkeit dieser Vorstellung vor. Das Vorkommen der Veränderungen nur an Geweben ektodermaler Herkunft erlaubt trotzdem den mangelnden Gaumenschluß auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. Zu nennen wäre hier die Störung des Epithelwachstums an der Falte, der Hirnentwicklung und dadurch eine Beeinflussung der Form des Schädelskelettes und schließlich eine Hemmung des Wachstums und der Reifung der Nerven. Unterdiesem Aspekt müßte in der Kultur der Angriffspunkt des 6-AN in das Epithel der Falten verlegt werden. Untersuchungen von PIELSTICKER zeigen aber, daß das Falten- gewebe unter dem Einfluß von 6-AN weniger RNA, DNA, Glucosaminoglycane, Proteine und Lipide synthetisiert. Die Einbauraten sind 10 Stunden nach Gabe von 6-AN teilweise um 50% verringert. Es ist deshalb fraglich, ob diese Veränderungen allein durch eine Wirkung am Epithel hervorgerufen werden. Zweifellos muß deshalb auch daran gedacht werden, daß Epithel und Mesenchym zunächst gleichermaßen betroffen sind, die morphologisch faßbaren Wirkungen sich aber nur am Epithel ausdrücken. Trotz dieser noch bestehenden Unsicherheiten in der Deutung, weisen die Befunde an den Gaumenkulturen sowohl von PIELSTICKER als auch von uns auf eine direkte

Wirkung des 6-AN an den Gaumenfalten hin.

Der hohe Prozentsatz des Gaumenschlusses unter in vitro Bedingungen, die Veränderungen der Resultate durch Variationen der Versuchsbedingungen und durch Zugabe bestimmter Substanzen läßt diese in vitro Technik als Untersuchungsmodell zur Erfassung normaler und gestörter Vorgänge beim Gaumenschluß als geeignet erscheinen. Dabei kann nach unseren Erfahrungen die Qualität des Modelles und die Empfindlichkeit auf teratogene Substanzen durch Verbesserung der Kultivierungstechnik (Veränderungen des Inkubationsmediums) und auch der Untersuchungstechnik (Biochemie, Histochemie und Autoradiographie) noch deutlich gesteigert werden.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die normale und die durch 6-Aminonikotinamid (6-AN) gestörte Gaumenentwicklung unter den Bedingungen einer modifizierten Trowell-Kultur untersucht.

Das für die Untersuchungen verwandte Material stammt von Rattenembryonen eines Wistarstammes. Den trächtigen Muttertieren wurde am Tag 14 + 8-9 eine einmalige Dosis von 8 mg/kg Körpergewicht 6-AN intraperitoneal injiziert. Von den am Tag 15 + 5-7 entnommenen Embryonen wurden Oberkieferpräparate hergestellt und 48 Stunden in modifiziertem YELP-Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für die Licht- und Elektronenmikroskopie fixiert und gefärbt.

Bei den Kontrollen erfolgte in einem hohen Prozentsatz ein Gaumenschluß, wobei eine echte Verschmelzung der Falten - als morphologisches Kriterium: Auflösung des Epithels und mesenchymales Durchwachsen - lichtmikroskopisch bewiesen werden konnte. Im elektronenmikroskopischen Bild findet man neben allgemein histiotypisch völlig unverändertem Verhalten ein besonderes Strukturelement: Cytolysosomen (autophagic vacuoles).

In den 6-AN behandelten Präparaten liegt lichtmikroskopisch in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle ein Klaffen der Falten und somit eine echte Gaumenspalte vor. Elektronenoptisch fällt hier eine charakteristische Veränderung auf: Die Verbreiterung der perinucleären Zysterne überwiegend in der basalen Zellschicht.

Eine exakte Deutung des multifaktoriellen Vorganges - Gaumenschluß - konnte mit dieser in vitro Methode jedoch nicht ermittelt werden, da der Einfluß der sog. exogenen Faktoren (besonders der Zungenumlagerung) teilweise ausgeschlossen wurde. Ein direkter Angriffspunkt des 6-AN am Faltengewebe und besonder am Epithel als ekto-dermalen Abkömmling scheint vorzuliegen.

Eine Verbesserung der in vitro Technik und umfassendere Untersuchungsmethodik könnten für weitere Aufklärungen dieser und anderer Probleme von großem Nutzen sein.

## LITERATURVERZEICHNIS

- ANDREW, F.D.  
ZIMMERMAN, E.F.  
Glucocorticoid Induction  
of Cleft Palate in Mice;  
No Correlation with Inhi-  
bition of Mucopolysaccha-  
ride Synthesis  
in: Teratology 4, 31-52  
(1971)
- BLUNK, M.  
Elektronenmikroskopische  
Untersuchungen am Epithel  
der Gaumenfortsätze von Rat-  
tenembryonen (Tag 14-18)  
in: Diss. Med. Fak., FU Ber-  
lin (1970)
- BRADFORD, C.  
Cleft Palate  
in: J. of Am. Medical Ass.  
206, 2120-2123 (1968)
- BRECHLER, K.R.  
MERKER, H.J.  
Gaumenschluß in vitro bei  
Rattenembryonen  
in: 1. Symposium des Sonder-  
forschungsbereiches 29, FU  
Berlin (1970) im Druck
- BURDI, A.R.  
FAIST, K.  
Morphogenesis of the palate  
in normal human embryos with  
special emphasis on the me-  
chanism involved  
in: Am. J. Anat. 120, 149-  
159 (1967)
- CALLAS, G.  
WALKER, B.E.  
Palate morphogenesis in mouse  
embryos after X-irradiation  
in: Anat. Rec. 145, 61-71  
(1963)

CHAMBERLAIN, I.G.

Development of cleft  
palate induced by 6 Ami-  
nonicotinamide late in  
rat gestation  
in: Anat. Rec. 156, 31-  
39 (1966)

CHAMBERLAIN, I.G.

Effects of acute vitamine  
replacement therapy on  
6 Aminonicotinamide in-  
duced cleft palate late  
in rat pregnancy  
in: Proc. Soc. Exp. Biol.  
Med. 124, 888-890 (1967)

CHAMBERLAIN, I.G.  
NELSON, M.M.

Congenital abnormalities  
in the rat resulting from  
single injections of 6-  
Aminonicotinamide during  
pregnancy  
in: J. Exp. Zool. 153,  
285-299 (1963)

CHAUDHRY, A.P.

In vitro study of fusion  
of palatal shelves in A-  
Jax embryos  
in: J. Dental Res. 46,  
257-260 (1967)

COLEMAN, R.D.

Development of the rat  
palate  
in: Anat. Rec. 151, 107-  
117 (1965)

- |                   |                                  |
|-------------------|----------------------------------|
| COPER, H.         | The influence of adre-           |
| LISON, H.         | nergic receptor blocking         |
| ROMMELSPACHER, H. | agents, 6-AN and Ampheta-        |
| SCHULZE, G.       | min on thermoregulation          |
| STRAUSS, S.       | in: Naunyn-Schmiedebergs         |
|                   | Arch. Pharmac. <u>270</u> , 378- |
|                   | 391 (1971)                       |
| DOSTAL, M.        | Morphogenesis of Cleft           |
|                   | Palate Induced by Exo-           |
|                   | genous Factors                   |
|                   | III Intraamniotic Appli-         |
|                   | cation of Hydrocortisone         |
|                   | in Mice                          |
|                   | in: Teratology <u>4</u> , 63-69  |
|                   | (1971)                           |
| DRILLIEN, C.M.    | The causes and natural           |
| INGRAM, T.T.S.    | history of cleft lip and         |
| WILKINSON, E.M.   | palate                           |
|                   | in: Williams + Wilins            |
|                   | Company Baltimore (1966)         |
| DeDUVE, C.        | From Cytases to Lysosomes        |
|                   | in: Fed. Proc. <u>23</u> , 1045- |
|                   | 1061 (1964)                      |
| FULTON, G.        | Closure of the human pa-         |
|                   | late in embryos (micros-         |
|                   | copic)                           |
|                   | in: Am. J. Obstet. Gynec.        |
|                   | <u>74</u> , 179-182 (1957)       |

- GOSS, A.N.  
BODNER, J.W.  
AVERY, J.K.
- Fusion capability of rat  
embryonic oral tissue in  
vitro  
in: Archives of Oral  
Biol. 15, 797-809 (1970)
- HANKS, H.
- Salze zur Herstellung von  
Hanks' Balanced Salt So-  
lution (HBSS)  
entnommen aus: Proc. Soc.  
Exp. Biol. Med. 71, 196  
(1949)
- HUGHES, L.V.  
FURSTMAN, L.  
BERNICK, S.
- Prenatal development of  
the rat palate  
in: J. dental Res. 46,  
373-379 (1967)
- HUMPHREY, T.
- The dynamic mechanism of  
palatal shelf elevation  
in human fetuses  
in: Anat. Rec. 160,  
369 (A), (1968)
- HUMPHREY, T.
- The relation between  
human fetal mouth ope-  
ning reflexes and closure  
of palate
- JACOBS, R.M.
- $S^{35}$  Liquid scintillation  
count analysis of morpho-  
genesis and teratogenesis  
of the palate in mouse  
embryos  
in: Anat. Rec. 132, 271-  
277 (1964)

- JACOBS, R.M.                      Histochemical study  
of morphogenesis and te-  
ratogenesis of the palate  
in mouse embryos  
in: Anat. Rec. 149, 691-  
697 (1964)
- JACOBS, R.M.                      Effects of cortisone ace-  
tate upon hydration of  
embryonic palate in two  
inbred strains of mice  
in: Anat. Rec. 156, 1-4  
(1966)
- JACOBS, R.M.                      Closure of embryonic pa-  
late: is spontaneous mus-  
cular activity essential?  
in: Teratology 2, 261 (A),  
(1969)
- JOONDEPH, D.R.  
WRAGG, L.E.                      Facial growth during the  
secondary palate closure  
in the rat  
in: Americ. J. of Ortho-  
dontics 60, 88-97 (1971)
- KOLBE, H.  
KELLER, K.  
LANGE, K.  
HERKEN, H.                      Studies of Carbohydrate  
metabolism in rat kidney  
after pharmacological  
blockade of the pentose  
phosphate pathway  
in: Naunyn-Schmiedebergs  
Arch. Exp. Pharmacol.  
271, 93-102 (1971)

- LARSSON, K.S.                      Studies on the closure of the secondary palate. II Occurrence of sulphomucopolysaccharides in the palatine processes of the normal mouse embryo  
in: Exp. Cell Res. 21, 498-503 (1960)
- LARSSON, K.S.                      Closure of secondary palate and its relation to sulphomucopolysaccharides  
in: Acta odontol. Scand. 20, Suppl 31, 1-35
- LEIMEISTER, M.L.                    Das elektronenmikroskopische Bild der Nerven und Gefäße in den Gaumenfortsätzen und im definitiven Gaumen bei Rattenembryonen (Tag 14-17)  
in: Diss. Med. Fak., FU Berlin (1970)
- LYNCH, J.B.  
LEWIS, S.R.  
BLOCKER, T.G.                      Cleft palate not explained by embryology  
in: Plast. Reconstr. Surg. 38, 552-554 (1966)
- MERCHANT, D.J.  
KAHN, R.H.  
MURPHY Jr., W.H.                    Zusammensetzung YELP-Medium  
aus: Handbook of Cell and Organ Culture,  
The University of Michigan, Medical School, Burgess Publishing Company (1960)

- MERKER, H.J. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Ratten-  
vagina unter normalen und  
experimentellen Bedingungen  
in: Habil. Arbeit an der  
FU Berlin (1964)
- MERKER, H.J. Die Lysosomen, eine neue  
Zellorganellgruppe  
in: Berliner Med. 15, 237  
(1964)
- MERKER, H.J. Unveröffentlichte Befunde  
und persönliche Mitteilung  
(1972)
- MERKER, H.J. Electron Microscopic Studies  
NOVACK, L. on the Effect of 6-Aminonicotinamide on the Mammalian Em-  
bryos  
ZIMMERMANN, B. in: Naunyn-Schmiedebergs Arch.  
Pharmak. 266, 401-402 (1970)
- MORIARTY, T.M. The development in vitro and  
WEINSTEIN, S. in vivo of fusion of the pala-  
GIBSON, R.D. tal processes of rat embryos  
in: J. Embryol. 11, 605-619  
(1963)
- MYERS, G.S. Effect of Sodium Fluoride and  
Sodium Pyruvate on Palatal De-  
velopment in vitro  
in: Anat. Rec. 171, 39-44  
(1971)
- MYERS, G.S. Tactors influence fusion of  
PETRAKIS, N.L. rat palates grown in vitro  
LEE, M. in: Anat. Rec. 162, 71-82  
(1968)

- NEUBERT, D. Biochemical aspects of te-  
 MERKER, H.J. ratology  
 KÖHLER, E. in: Advances in Biosciences  
 KROWKE, R. 6, 575-620 (1970)  
 BARRACH, H.J.
- NEUNER, B. Das elektronenmikroskopische  
 Bild des Mesenchyms der Gau-  
 menfalten bei Rattenembryo-  
 nen (Tag 14-17)  
 in: Diss. Med. Fak., FU Ber-  
 lin (1969)
- NOVIKOFF, A.B. Golgi-Apparatur und Lyso-  
 ESSNER, E. somes  
 QUINTANA, N. in: Fed. Proc. 23, 1010-  
 1044 (1964)
- PETER, K. Atlas der Entwicklung der Na-  
 se und des Gaumens beim Men-  
 schen  
 Gustav Fischer, Jena (1913)
- PIELSTICKER, K. Untersuchungen über den  
 Stoffwechsel fetaler Gau-  
 menfalten und den Einfluß  
 von 6-Aminonikotinamid  
 in: Diss. Med. Fak. FU Ber-  
 lin (1972)
- POURTOIS, M. Onset of the acquired poten-  
 tiality for fusion in the  
 palatal shelves of rats  
 in: J. Embr. Exp. Morph. 16,  
 171-182 (1966)
- POURTOIS, M. Amniotic fluid and palatal  
 fusion in the rat  
 in: Arch. Oral Biol. 13, 87-  
 92 (1968)

- POURTOIS, M.                      Action de l'actinomycine  
D sur la fusion des crêtes  
palatines du rat cultivées  
in vitro  
in: Archives of Oral Biol.  
15, 675-676 (1970)
- POURTOIS, M.                      The fate of rat palatal  
shelves cultivated in  
vitro in the presence of  
periodic acid  
in: Archives of Oral Biol.  
16, 503-507 (1971)
- REEVE, W.L.  
PORTER, K.  
LEFKOWITZ, W.                      In vitro closure of the  
rat palate  
in: J. Dental Res. 45,  
1375-1380 (1966)
- ROSS, R.B.                          Cranial base and cervi-  
cal vertebrae in palate  
and prepalate clefts  
in: Cleft Palate Bull.  
10, 60-71 (1960)
- ROSS, R.B.  
LINDSAY, W.K.                      The cervical vertebrae  
as a factor in the etio-  
logy of cleft palate  
in: Cleft Palate J. 2,  
273-282 (1965)
- ROSS, L.M.  
WALKER, B.E.                      Movement of palatine shelf  
in untreated and teratogen-  
treated mouse embryos  
in: Am.J.Anat. 121, 509-  
521 (1967)

- SHAPIRA, Y.                      An Autoradiographic Study  
of  $^3\text{H}$ -Proline Uptake in  
the Palate of Normal Mice  
and in the Palate of Mice  
Treated with Hydrocorti-  
sone  
in: J. of Dental Research  
48, 1039-1042 (1969)
- STEFFEK, A.J.                    The Histology of Palatal  
VERRUSIO, A.C.                  Closure in the Rhesus  
KING, C.T.G.                    Monkey  
in: Teratology 1, 425-  
438 (1968)
- SWENEY, L.R.                    Histogenesis of Swiss  
SHAPIRO, B.L.                  White Mouse Secondary  
Palate from Nine and  
one-half Days to Fifteen  
and one-half Days in Utero.  
I. Epithelial - Mesenchy-  
mal Relationships - Light  
and Electron Microscopy  
in: J. of Morphology 130,  
435-451 (1970)
- TÖNDURY, G.                    On the mechanism of cleft  
formation  
in: Congenital anomalies  
of the face and associated  
structures  
(S. PRUZANSKY, ed)  
Springfield: Thomas 85-101  
(1961)

- TRASLER, D.G.  
FRASER, F.C.  
Role of the tongue in producing cleft palate in mice with spontaneous cleft lip  
in: Dev. Biol. 6, 45-60  
(1963)
- TROWELL, O.A.  
The culture of mature organ in a synthetic medium  
in: Exp. Cell. Res. 16, 118-147 (1959)
- TURBOW, M.M.  
CHAMBERLAIN, J.G.  
Direct effects of 6-AN on the developing rat embryo in vitro and in vivo  
in: Teratology 1, 103-108  
(1968)
- VARGAS, V.  
Palatal fusion in vitro in the mouse  
in: Arch. Oral. Biol. 12, 1283-1288 (1967)
- VERRUSIO, A.C.  
A mechanism for closure of the secondary palate  
in: Teratology 2, 271 (A), (1969)
- VERRUSIO, A.C.  
A mechanism for closure of the secondary palate  
in: Teratology 3, 17-20  
(1970)

- WALKER, B.E.                      Induction of Cleft Palate  
in Rats with Antiinflammatory Drugs  
in: Teratology 4, 39-57  
(1971)
- WALKER, B.E.                      The embryology of cortisone - induced cleft palate  
in: J. Embr. Exp. Morph. 5, 201-209 (1957)
- WALKER, B.E.                      Effects on palate development of mechanical interference with the fetal environment  
in: Science 130, 981-982  
(1959)
- WALKER, B.E.                      The association of mucopolysaccharides with morphogenesis of the palate and other structures in mouse embryos  
in: J. of Embr. Exp. Morph. 9, I, 22-31 (1961)
- WALKER, B.E.                      Spontaneous embryonic movement in relation to palate closure  
in: Teratology 1, 222-223  
(A), (1968)

- WALKER, B.E.                      Workshop on embryology  
of cleft lip and cleft  
palate  
in: Teratology 1, 353-358  
(1968)
- WALKER, B.E.                      Correlation of embryonic  
movement with palate  
closure in mice  
in: Teratology 2, 191-  
198 (1969)
- WALKER, B.E.                      Palate morphogenesis in  
the rabbit  
in: Archives of Oral Biol.  
16, 275-281 (1971)
- WALKER, B.E.  
CRAIN, B.                      Effects of hypovitaminosis  
A on palate development  
in two strains of mice  
in: Am. J. Anat. 107, 49-  
58 (1960)
- WALKER, B.E.  
FRASER, F.G.                      Closure of the secondary  
palate in three strains  
of mice  
in: J. Embryol. Exp. Morph.  
4, 176-189 (1956)
- ZEILER, K.B.  
WEINSTEIN, S.  
GIBSON, R.D.                      A study of the morphology  
of the time of closure of  
the palate in the albino  
rat  
in: Arch. Oral Biol. 9,  
549-554 (1964)

Abbildung 1:

Darstellung der Schnittlinien an einem  
Rattenembryo zur Gewinnung der in unseren  
Versuchen verwendeten Oberkieferpräparate

1



Abbildung 2:

Oberkieferpräparat nach Kultivationsdauer von 48 Stunden, Ansicht von oral. Geschlossener Gaumen mit deutlicher Uvulakerbe (Pfeile).

Abbildung 3:

Oberkieferpräparat nach Kultivationsdauer von 48 Stunden, Ansicht von oral. Geschlossener Gaumen mit Schließungsdefekt im vorderen Bereich (Pfeile).

2



3

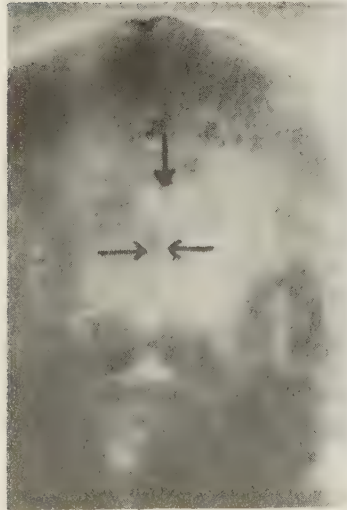


Abbildung 4:

Querschnitt durch ein kultiviertes Oberkieferpräparat nach Schluß des Gaumens (X = Gasphase, \* = Membranfilterfläche, Pfeile = Jakobsonsches Organ). Deutliche Verdichtung des Gewebes zur Gasphase hin.

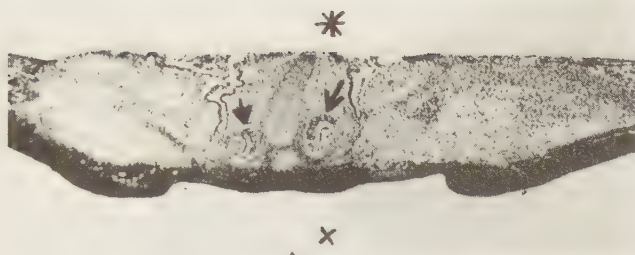
Abbildung 5:

Querschnitt durch ein kultiviertes Oberkieferpräparat nach Schluß des Gaumens (X = Gasphase, \* = Membranfilterfläche). Deutliche Verdichtung des Gewebes zur Gasphase hin.

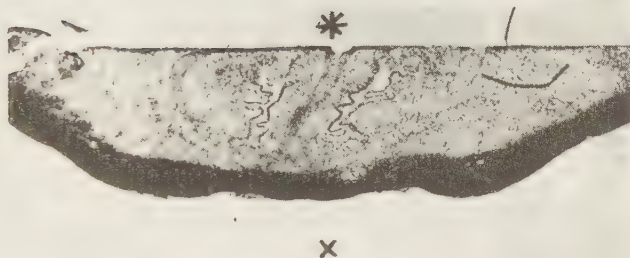
Abbildung 6:

Höhere Vergrößerung eines Oberkieferpräparates mit nur angedeuteter Verschmelzung der Gaumenfalten. Persistenz des Epithels an der Berührungsstelle (Pfeile). Verschmelzungsneigung zwischen Nasenseptum und Gaumenfortsätze (\*).

4



5



6

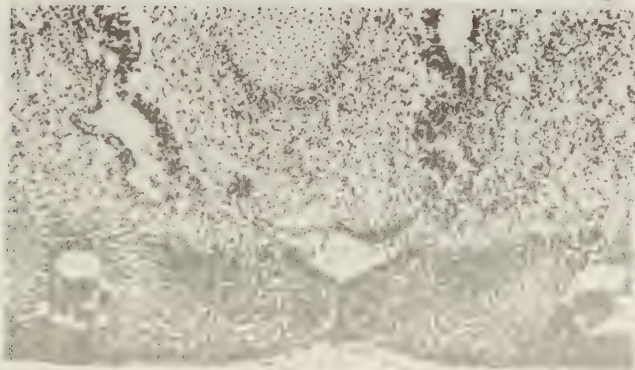


Abbildung 7:

Oberkieferpräparat nach Kultivationsdauer von 48 Stunden und nach 6-AN-Behandlung des Muttertieres, Ansicht von oral. Vollständige Gaumenspalte (Pfeile).

Abbildung 8:

Querschnitt durch ein Oberkieferpräparat nach Kultivationsdauer von 48 Stunden und nach 6-AN-Behandlung des Muttertieres. Deutliches Klaffen der Gaumenspalte. Keine Verschmelzung zwischen Gaumenfalten und Nasenseptum. (X = Gasphase, \* = Membranfilterfläche)

7



8



Abbildung 9:

Elektronenmikroskopisches Bild der Epithelbindegewebsgrenze im Bereich der Gaumenfalten (Pfeile). (Oberkieferpräparat nach Kultivationsdauer von 48 Stunden und 6-AN-Behandlung des Muttertieres.) Morphologisch unveränderte Mesenchymzellen (M) mit intakten Zellorganellen. In den weiten Interzellularräumen (I) erste Kollagenstrukturen. Im Epithel riesige Vacuolen (X).

Vergrößerung 1:21000

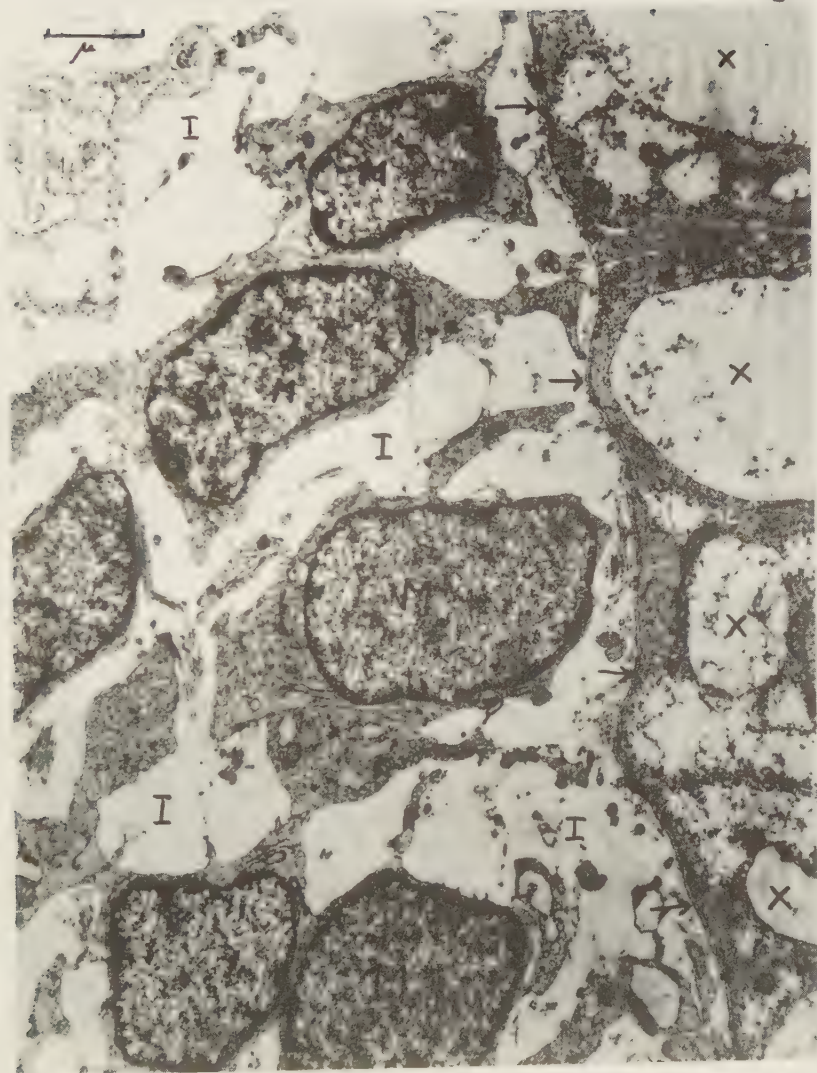
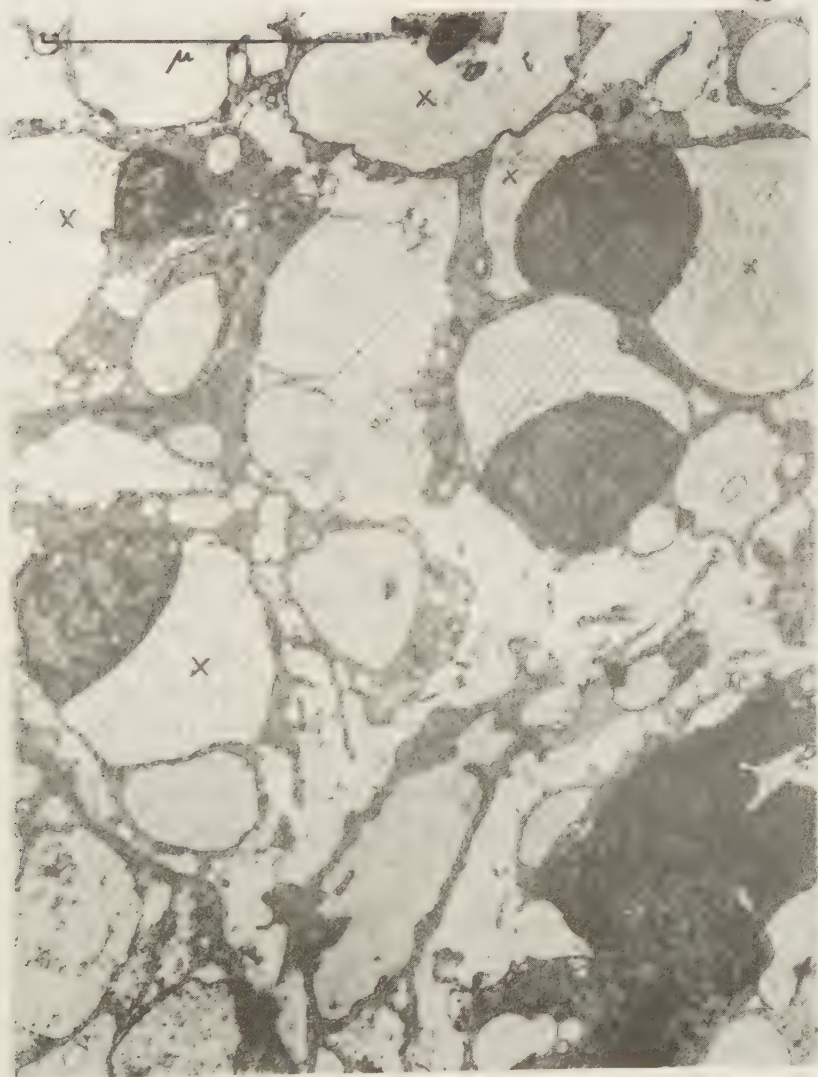


Abbildung 10:

Elektronenmikroskopisches Bild im Bereich eines Zahnkeimes. (Oberkieferpräparat nach Kultivationsdauer von 48 Stunden und nach 6-AN-Behandlung des Muttertieres.) Extreme Erweiterung der perinucleären Zysternen (X).

Vergrößerung 1:7000



Herrn Professor Dr.med. H.J. Merker danke ich  
herzlich für die Überlassung des Themas und die  
freundliche Hilfe bei der Durchführung dieser  
Arbeit.

## LEBENS LAUF

Am 12. April 1943 wurde ich als Sohn des Malermeisters Karl Brechler und seiner Ehefrau Katharina, geb. Rohloff, in Schönlanke in Pommern geboren.

Durch Kriegseinwirkungen kam mein Vater 1945 um und meine Mutter, meine zwei Geschwister und ich wurden nach Uetze, Niedersachsen, vertrieben.

In Uetze besuchte ich die Volksschule und ab dem 5. Schuljahr das dortige neusprachliche Gymnasium. Nach bestandener Reifeprüfung, im Frühjahr 1964, absolvierte ich einen zweijährigen Wehrdienst. Danach arbeitete ich ein halbes Jahr in einem Finanzamt als Angestellter, bis ich mich zum Wintersemester 1966/67 an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, der ich ununterbrochen angehört habe, immatrikulieren konnte.

Das Vorphysikum bestand ich nach dem 2., das Physikum nach dem 5. und das zahnmedizinische Staatsexamen nach dem 10. Semester, jeweils mit der Note 'gut'.

Nach Erhalt der Approbationsurkunde werde ich ab 1. März 1972 als Assistent in einer zahnärztlichen Praxis in Krefeld tätig sein.





DIFO-DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216